

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 24.07.92.

⑫③ Priorité : 12.09.91 KR 9115909.

⑫④ Date de la mise à disposition du public de la demande : 19.03.93 Bulletin 93/11.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Le rapport de recherche n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *MIWON CO LTD — KR.*

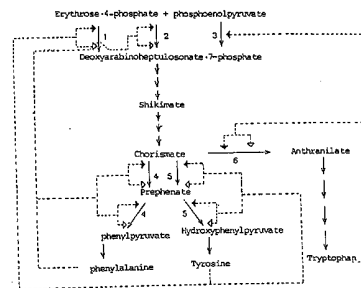
⑦② Inventeur(s) : *Kim Hwa Young, Rhym Hong, Lee Dong Joon, Won Chan Hee, Lim Byung Lak et Choi Hong Kyu.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : *Cabinet Hirsch Conseil en Brevets d'Invention.*

⑤④ Nouveau plasmide recombinant replicable pour la production de phénylalanine.

⑤⑦ Un nouveau E. coli (KCCM 10 013) qui peut produire des rendements élevés de L-phénylalanine et un procédé de production de L-phénylalanine par E. coli recombinant qui peut être transformé avec un nouveau plasmide pMW16 contenant deux promoteurs et un répresseur sensible à la température pour manifester un gène pheA et un gène aroF, dans lequel la chorismate mutase p-préphénate est codée par le gène pheA et la 3-déoxy-D-arabino-heptulosonate.7-phosphate synthase est codée par l'aroF.



1. est la DAHP synthase codée par le gène aroF (inhibé par la tyrosine);
2. est la DAHP synthase codée par le gène aroF (inhibé par la phénylalanine);
3. est la DAHP synthase codée par le gène aroF (inhibé par la tryptophane);
4. est la chorismate mutase p-préphénate codée par pheA;
5. est la chorismate mutase p-préphénate déhydrose codée par tyrA;
6. est l'anthranilate synthase codée par trpE.

-----> est une inhibition par rétro-action
 —————> est une répression par rétro-action

FR 2 681 330 - A1



NOUVEAU PLASMIDE RECOMBINANT REPLICABLE POUR
LA PRODUCTION DE PHENYLALANINE

La présente invention a pour objet un procédé de pro-
duction de L-phénylalanine par *Escherichia coli* recombinant
(ci-après "*E. coli*"). Plus particulièrement, la présente
invention a pour objet un nouvel *E. coli* contenant un plas-
mide pour la production de L-phénylalanine et un procédé pour
la production de L-phénylalanine par emploi de ce nouveau
microbe.

La L-phénylalanine est un amino-acide essentiel et peut
être utilisée pour la production par synthèse d'ASPARTAME®,
un agent édulcorant. Il existe beaucoup de méthodes connues
faisant emploi de microbes pour la production de L-phényl-
alanine. Par exemple, JP-A-37-6 345 et 60-160 890 décrivent
un procédé de production de L-phénylalanine par emploi de
Brevibacterium ou *Corynebacterium sp.* qui nécessite de la
tyrosine. JP-A-55-165 797 décrit une méthode similaire par
emploi d'*E. coli* qui requiert de la tyrosine et qui est ré-
sistant vis-à-vis des analogues de la tryptophane. KR-A-88-
11 331 et 88-11 332 décrivent une méthode similaire par em-
ploi d'*E. coli* qui est revertant d'auxotrophe de tryptophane
et de tyrosine et qui est résistant aux analogues de phényl-
alanine, tyrosine et tryptophane. KR-A-89-3 682 et 89-3 714
décrivent des procédés de production de phénylalanine par
E. coli recombinant qui amplifie le nombre de copies d'un
gène qui code pour une enzyme limitatrice de la vitesse.

La présente invention a par conséquent pour objet un
nouvel *E. coli* (KCCM 10 013) qui peut produire de grands
rendements en L-phénylalanine.

Un autre objet de la présente invention est de fournir un procédé de production de L-phénylalanine par *E. coli* recombinant qui peut être transformée avec un nouveau plasmide pMW26 contenant deux promoteurs et un répresseur sensible à la température pour manifester le gène pheA et un gène aroF. La chorismate mutase p-préphénate déshydratase est codée par le gène pheA et la 3-déoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase est codée par l'aroF.

Un autre objet de la présente invention est de fournir un plasmide recombinant replicable pMW16 qui est capable de transformer un *E. coli* pour produire un *E. coli* transformé donnant lieu à une production de phénylalanine très élevée.

Un autre objet de la présente invention encore est de fournir un procédé de production de phénylalanine en un rendement élevé, qui comprend la culture d'*E. coli* selon la présente invention dans un milieu de culture.

D'autres buts et objets de la présente invention deviendront apparents à la lecture de la description détaillée qui suit. Il doit être compris cependant que cette description détaillée et les exemples spécifiques, bien qu'indiquant des modes de réalisation préférés de la présente invention, ne sont donnés qu'à titre illustratif, bien que de nombreux changements et de modifications entrant dans le cadre de la présente invention seront apparents à l'homme de l'art à partir de cette description détaillée.

La présente invention sera mieux comprise et de façon plus détaillée à partir de la description détaillée ci-dessous et des figures accompagnantes qui sont donnés à titre d'illustration, et non limitatifs de la présente invention, et dans lesquels:

- la figure 1 illustre le cheminement métabolique de la biosynthèse des amino-acide aromatiques dans *E. coli*; et
- la figure 2 illustre les étapes de préparation d'un plasmide recombinant pMW16 et sa carte de restriction.

Les gènes aroF et pheA destinés à être employés pour la

production de L-phénylalanine sont dérivés d'*E. coli* MWPWJ 304 (KCCM 10 013).

En se référant maintenant en détail aux figures données à des fins d'illustration de la présente invention, tel que
5 décrite dans la figure 1, le procédé de préparation de L-phénylalanine à l'aide de plasmide recombinant est contrôlé par action enzymatique dans les cellules d'*E. coli*. Une des enzymes qui contrôle la réaction est la chorismate mutase P-préphénate déhydratase. Une des autres enzymes qui contrôle
10 la réaction est l'enzyme 3-déoxy-D-arabino-heptulosonate.7-phosphate synthase (ci-après appelée "DAHP synthase"). La DAHP synthase existe sous forme de trois isoenzymes qui sont codés par les gènes *aroF*, *aroG* et *aroH*, respectivement. Dans la présente invention, afin d'augmenter sensiblement la pro-
15 duction de *pheA* et *aroF*, un promoteur P_L de phase λ est connecté à chacun des gènes et un répresseur sensible à la température est utilisé pour contrôler la production du gène.

Tel que décrit dans la figure 2, le procédé de prépa-
20 ration du plasmide pMW16 est décrit dans Recombinant DNA Methodology and Molecular Cloning. Le procédé recombinant pour la préparation du plasmide pMW16 est décrit dans Molecular Cloning, A Laboratory Manual (T. Mariatis et al.) et Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. Ausubel et al.).

25 Ainsi, une nouvelle souche MWPWJ 304 destinée à être employée pour la fabrication de L-phénylalanine est obtenue. La nouvelle souche MWPWJ 304 a été déposée à la Korean Fermentation Culture Collection le 30 août 1991 selon les conditions du Traité de Budapest et sous le numéro de dépôt
30 KCCM 10 013.

La présente invention est maintenant décrite plus en détail grâce aux exemples suivants qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs de la présente invention.

35 EXEMPLE 1

Préparation de plasmide pMW16

(1) Isolement de l'ADN du pMW12

Le pMW12 (US-A-5 008 190 et 5 030 567), un plasmide

recombinant contenant le gène pheA et le gène aroF, est digéré avec EcoRV dans un milieu salin tampon pour enzyme de restriction [50 mM de chlorure de sodium, 10 mM de tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de chlorure de magnésium et 1 mM de dithiothréitol] à 37°C pendant 5 16 heures. L'ADN digéré est traité avec un mélange phénol/chloroforme et précipité par de l'éthanol pour produire un plasmide ADN linéarisé. Ce plasmide ADN est traité avec de la phosphatase alcaline d'intestin de 10 veau (ci-après "CIP") pour empêcher que l'ADN de plasmide linéarisé ne s'auto-ligature.

(2) Obtention du fragment de promoteur P_L

Le plasmide pPL_C 2833 est digéré par l'enzyme de restriction *Hae II* et *Bam HI* et un fragment P_L de 0,26 Kb est récupéré sur un gel d'agarose ayant un point de 15 fusion bas puis purifié. Le fragment de P_L de 0,26 Kb ayant une extrémité cohesive est traité par du polymérase ADN T_4 dans un milieu tampon de réaction [50 mM de tris-HCl (pH 8,0), 5 mM de chlorure de magnésium, 20 5 mM de dithiothréitol, 50 µg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA), 100 µM de dATP, 100 µM de dGTP, 100 µM dCTP et 100 µM dTTP) à une température de 11°C pendant 20 minutes pour former des extrémités franches.

(3) Préparation de plasmide pMW14

Le plasmide pMW12 linéarisé traité à la phosphatase de 25 l'étape ci-dessus (1) est mélangé avec le fragment de promoteur P_L ayant des extrémités franches aux deux extrémités obtenu dans l'étape mentionnée (2) ci-dessus en une proportion de 1/3 est traité par de la ligase 30 ADN T_4 à une température de 16°C pendant 16 heures de façon à ligaturer les fragments. Le plasmide recombinant combiné est transformé par la méthode conventionnelle au chlorure de calcium en un *E. coli* MWEC203-7 qui nécessite pour sa croissance de la phénylalanine. 35 La souche transformée est cultivée dans un milieu de culture MM contenant 50 µg/ml d'antibiotique Kanamycine (10 g de glucose, 4 g de sulfate d'ammonium, 2 g de phosphate de potassium monobasique, 1 mg de thiamine-

HCl, 0,5 g d'acide fumarique, 20 g d'agar, 1 litre d'eau distillée à pH 7,4). Le plasmide recombinant pMW14 est séparé de la souche cultivée qui se développe dans le milieu de culture MM contenant 50 µg/ml de Kanamycine.

5

(4) Préparation de pMW15

Le plasmide pMK5 contenant un gène CI_{857} d'un répres-
seur sensible à la température est traité par l'enzyme
de restriction Bgl II et le fragment d'ADN de 0,8 Kb
est récupéré sur un gel d'agarose 0,9% puis ensuite
traité avec la polymérase ADN T_4 pour former les extré-
mités franches. Le plasmide pMW14 de l'étape mentionnée
ci-dessus (3), qui est combiné avec le promoteur P_L au
début du gène *aroF* est digéré par l'enzyme Dra III et
traité avec du CIP de façon à retirer les groupes 5'-
phosphate. Ensuite, le plasmide pMW14 traité est mé-
langé avec le fragment CI_{857} ayant des extrémités fran-
ches aux deux extrémités et qui sont jointes par la
ligase ADN T_4 . Le plasmide recombinant est transformé
en *E. coli HB101* pour produire pMW15.

10

15

20

(5) Préparation de pMW16

Le plasmide recombinant pMW15 isolé est digéré avec
l'enzyme Bam HI et Bgl II et traité avec la ligase ADN
 T_4 pour produire pMW16. Le plasmide pMW15 contient le
gène *tyrA* entier. Dans pMW16, un fragment 0,7 Kb du
gène *TyrA* en est retiré. Le plasmide recombinant pMW16
est transformé en une souche laissant s'échapper la
tyrosine et sensible à la température, *E. coli* MWWJ 304
(KFCC 10737, qui a fait l'objet d'un dépôt à la Korean
Fermentation Culture Collection, 30 août 1991) puis est
cultivé dans un milieu de culture contenant 50 µg/ml de
Kanamycine à 37°C pendant 24 heures. Parmi les souches
transformées par pMW16, la meilleure souche pour pro-
duire la L-phénylalanine, MWPWJ 304 (KCCM 10 013, dépo-
sée à la Korean Culture of Microorganisms, 28 janvier
1992) est isolée. Les propriétés biochimiques de la
nouvelle souche MWPWJ 304 (KCCM 10 013) sont les mêmes
que celles de la souche hôte MWWJ 304 (KFCC 10 737).

25

30

35

Cependant, la nouvelle souche MWPWJ 304 nécessite plus de tyrosine pour se développer et produire de la L-phénylalanine par comparaison à la souche hôte MWWJ 304. Le rendement en L-phénylalanine et l'activité de la DAHP synthase de la nouvelle souche MWPWJ 304 sont augmentés.

EXEMPLE EXPERIMENTAL 1

L'activité enzymatique et le rendement en L-phénylalanine de la nouvelle souche MWPWJ 304 sont augmentés par comparaison à la présente souche comme suit (tableau I, tableau II):

TABLEAU I

Activité enzymatique de la DAHP synthase

Souche	Température de culture	Activité enzymatique
		Unités
MWPEC 13-60 (KCTC 8337P)	32°C	1,0
MWWJ 304 (KFCC 10 737)	37°C	0,9
MWPWJ 304 (KCCM 10 013)	37°C	3,1

Les données ci-dessus sont obtenues par la méthode de I. Shio et al. (Journal of Biochemistry, 75, 987-997, 1974). L'activité enzymatique de la MWPWJ 304 (KCCM 10 013) est basée sur celle de la MWPEC 13-60 (KCTC 8337 P). Le milieu de culture de la MWWJ 304 (KFCC 10 737) et MWPWJ 304 (KCCM 10 013) contient 100 mg/l supplémentaires de L-tyrosine comparé à la MWPEC 13-60.

EXEMPLE 2

Préparation de L-phénylalanine

(A) Souche	
	MWPWJ 304 (KCCM 10 013)
(B) Milieu de culture	
	Glucose 3%
	Tryptone 1%
	Extrait de Bacto levure 1%
	Chlorure de sodium 0,1%
	Kanamycine 10 mg/l
	pH 7,0

(C) Milieu de fermentation	
	Glucose 6%
	Sulfate de potassium 0,04%
	Sulfate d'ammonium 2%
5	Citrate de sodium 0,05%
	Acide fumarique 0,05%
	Chlorure de magnésium 0,08%
	Phosphate de potassium monobasique 0,1%
	Phosphate de potassium dibasique . 0,1%
10	Extrait de Bacto levure 0,1%
	Glutamate de monosodium 0,05%
	Chlorure de cobalt 0,1 mg/l
	Sulfate de zinc 1 mg/l
	Chlorure de manganèse 2 mg/l
15	Chlorure de calcium 5 mg/l
	Chlorure ferrique 20 mg/l
	L-tyrosine 300 mg/l
	Chlorhydrate de thiamine 10 mg/l
	Acide nicotinique 10 mg/l
20	pH 7,0

(D) Méthode de fermentation

40 ml du milieu de culture sont chargés dans un récipient test de 500 ml et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Après stérilisation, la nouvelle souche *E. coli* MWPWJ 304 (KCCM 10 013) est inoculée dans le récipient et mis en culture à 37°C pendant 16 heures sous agitation. Le milieu de fermentation est préparé à partir de la formulation ci-dessus. Après que 3,5% du carbonate de calcium autoclavé séparément ont été ajoutés au milieu de fermentation et que 2 ml d'un bouillon de germe y ont été ajoutés, le milieu de fermentation est agité et fermenté à 37°C pendant 36 heures. A l'issue de la fermentation, la quantité de L-phénylalanine accumulée est de 16,2 g/l.

35 EXEMPLE 3

Préparation de L-phénylalanine

La souche (A), le milieu de culture (B) et de milieu de fermentation (C), à l'exception des 400 mg/l de L-tyrosine,

sont les mêmes que dans les exemples 1 et 2.

(D) Méthode de fermentation

1 litre du milieu de fermentation est chargé dans un fermenteur de 2 litres et autoclavé à 120°C pendant 15 minutes. La nouvelle souche MWPWJ 304 (KCCM 10 013) est ajoutée à 50 ml du milieu de culture dans un récipient de 500 ml et mis en culture à 37°C pendant 16 heures avec agitation. 50 ml du bouillon de culture sont chargés dans le fermenteur avec une agitation de 1 000 tr/min et un débit de 1,0 vvm (débit d'oxygène) à 37°C pendant 48 heures. Pendant la fermentation, un pH de 7,0 est maintenu par addition d'hydroxyde d'ammonium puis une solution de glucose à 60% est ajoutée au fermenteur à trois reprises lorsque le niveau de glucose chute en-dessous de 1%.

La quantité totale de glucose qui est utilisée dans la fermentation est de 185 g/l. La L-phénylalanine est obtenue avec une concentration de 50,8 g/l. 1 litre de la solution de fermentation est purifié par une méthode conventionnelle, telle que l'absorption avec une résine échangeuse d'ions, et isolement avec de l'hydroxyde d'ammonium pour produire 45,7 g/l de L-phénylalanine sous forme de cristaux bruts.

TABLEAU II

Rendement en L-phénylalanine (g/l)

T °C de la culture	Souche	MWWJ 304 (KFCC 10 737)	MWPWJ 304 (KCCM 10 013)
	31		14,9
34		20,6	21,2
37		31,5	50,8
39		15,5	22,8

* 200 mg/l de L-tyrosine sont ajoutés au milieu de fermentation de MWWJ 304 (KFCC 10 737).

EXEMPLE 4

L'exemple 3 est répété à l'exception que 27 litres de culture sont chargés dans un fermenteur de 50 litres et 1,3 litres du bouillon de culture sont chargés dans le fermenteur
5 sous agitation à raison de 450 tr/min et avec un débit de 1,0 vvm. La quantité de L-phénylalanine produite est de 49,1 g/l.

L'invention ayant été ainsi décrite, il est évident qu'elle donne lieu à de nombreuses variantes. Ces variantes
10 ne doivent pas être considérées comme limitant la portée de la présente invention, et toutes ces variantes telles qu'évidentes à l'homme de l'art sont comprises dans la portée des revendications suivantes.

15

20

25

30

35

REVENDEICATIONS

1.- Un plasmide recombinant replicable comprenant de l'ADN de plasmide contenant deux promoteurs et un répresseur sensible à la température pour manifester un gène pheA qui code la chorismate mutase p-préphénate déhydratase et un gène aroF qui code la 3-déoxy-D-arabino-heptulosonate.7-phosphate synthase, ledit plasmide recombinant étant identifié comme le plasmide pMW16 contenu dans *E. coli* MWPWJ 304 (KCCM 10 013), qui est capable de transformer un *E. coli* et produire un *E. coli* transformé ayant une capacité de production de phénylalanine optimale.

2.- Le plasmide recombinant replicable selon la revendication 1, dans lequel lesdits promoteurs sont des promoteurs λP_L .

3.- Le plasmide recombinant replicable selon la revendication 1, dans lequel ledit répresseur sensible à la température est un répresseur CI₈₅₇.

4.- Un *E. coli* MWPWJ 304 (KCCM 10 013) qui a une capacité de production de phénylalanine optimale en vertu du fait qu'il contient les gènes pheA et aroF.

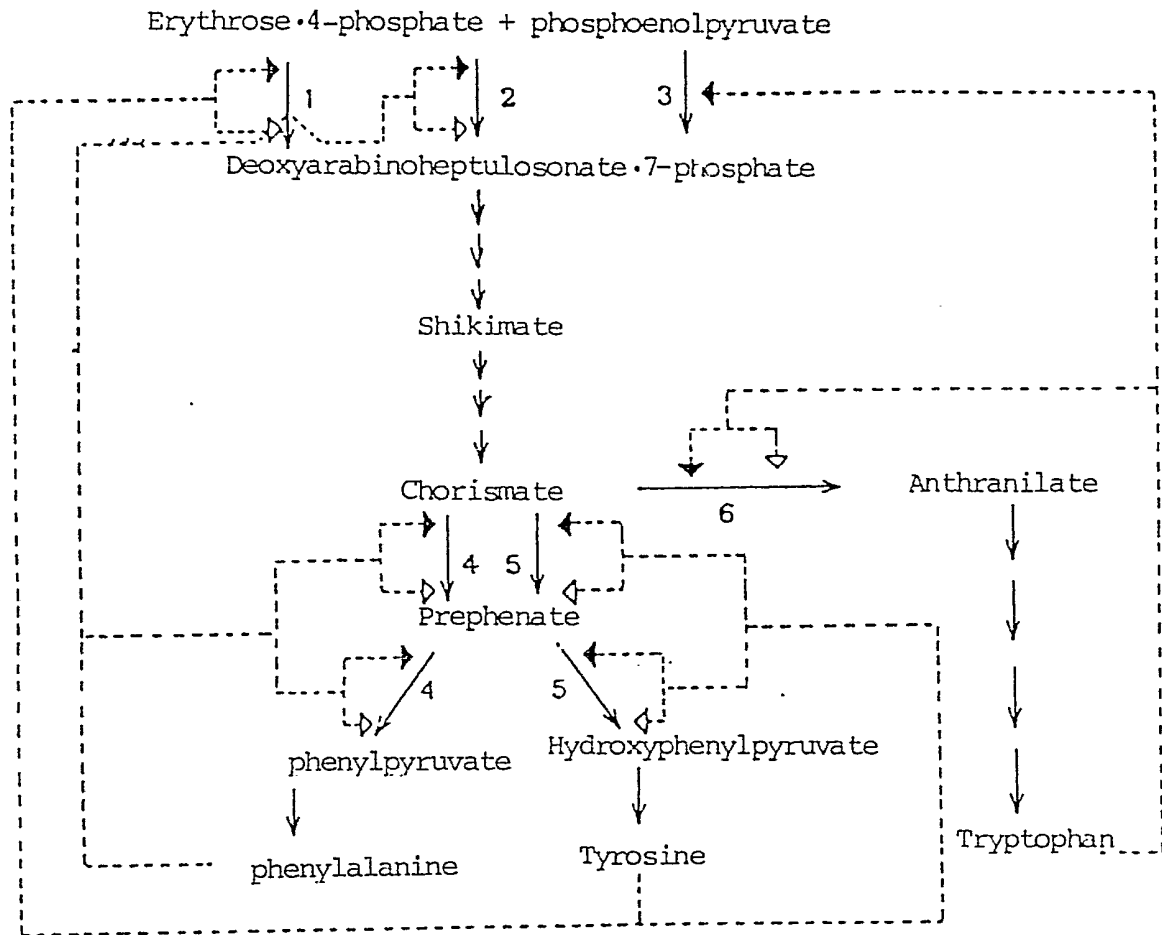
5.- Un procédé de production de phénylalanine qui comprend la mise en culture d'une souche d'*E. coli* qui contient le plasmide du KFCC 10 738 dans un milieu de culture.

6.- Le procédé de production de phénylalanine selon la revendication 5, dans lequel ladite culture est mise en oeuvre en présence de sucre.

7.- Le procédé de production de phénylalanine selon la revendication 6, dans lequel ledit sucre est le glucose.

8.- Le procédé de production de phénylalanine selon la revendication 6, dans lequel ladite culture est mise en oeuvre à une température de 37°C.

FIG. 1



1. est la DAHP synthase codée par le gène *aroF* (inhibé par la tyrosine)
2. est la DAHP synthase codée par le gène *aroF* (inhibé par la phénylalanine)
3. est la DAHP synthase codée par le gène *aroF* (inhibé par la tryptophane)
4. est la chorismate mutase p-préphénate déhydrose codée par *pheA*
5. est la chorismate mutase p-préphénate déhydrose codée par *tyrA*
6. est l'antranylate synthase codée par *trpE*.

-----▷ est une inhibition par rétro-action

————▷ est une répression par rétro-action

FIG.2

